

学校编码：10384

密级\_\_\_\_\_

学号：31120091151105

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

# 海绵和海鞘中可培养放线菌多样性的比较研究

A Comparative Study on the Phylogenetic Diversity of  
Culturable Actinobacteria Associated with Marine Sponges  
and Ascidians

杨 琪

指导教师姓名：张 卫 教授

柯才焕 教授

专 业 名 称：海洋生物技术

论文提交日期：2012 年 8 月

论文答辩时间：2012 年 9 月

2012年8月

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“        ”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目 录

摘要 .....	I
ABSTRACT .....	III
第1章 文献综述 .....	1
1.1 引言 .....	1
1.2 海绵及相关微生物 .....	2
1.2.1 海绵简介 .....	2
1.2.2 海绵相关微生物多样性 .....	2
1.2.3 海绵与其共生微生物之间的关系 .....	3
1.2.4 海绵及其相关微生物中的活性产物 .....	4
1.2.4.1 海绵活性产物研究 .....	4
1.2.4.2 海绵相关微生物来源的活性物质研究 .....	5
1.3 海鞘及相关微生物 .....	7
1.3.1 海鞘简介 .....	7
1.3.2 海鞘相关微生物多样性的研究 .....	8
1.3.3 海鞘中活性产物的研究 .....	8
1.4 海绵和海鞘相关放线菌的多样性 .....	9
1.5 海洋微生物多样性研究方法 .....	12
1.5.1 培养分离方法在海洋微生物多样性研究中的应用 .....	12
1.5.2 分子生物学技术在海洋微生物多样性研究中的应用 .....	13
1.5.2.1 16Sr RNA 基因序列研究 .....	13
1.5.2.2 核酸杂交分析技术 .....	13
1.5.2.3 基于 PCR 技术的研究方法 .....	14
1.5.3 分子方法和分离培养方法相结合的应用 .....	14
1.5.4 海绵相关放线菌多样性研究方法进展 .....	15
1.6 研究意义与目的 .....	17
1.6.1 研究意义 .....	17

1.6.2 研究目的 .....	18
<b>第 2 章 海绵和海鞘中放线菌的分离 .....</b>	<b>20</b>
2.1 引言 .....	20
2.2 材料和方法 .....	21
2.2.1 材料 .....	21
2.2.1.1 样品采集 .....	21
2.2.1.2 海绵和海鞘种类鉴定 .....	22
2.2.1.3 试剂 .....	23
2.2.1.4 仪器 .....	24
2.2.2 方法 .....	24
2.2.2.1 海绵和海鞘样品的前处理 .....	24
2.2.2.2 分离培养基 .....	24
2.2.2.3 海绵和海鞘中放线菌的分离培养 .....	25
2.2.2.4 菌种保存 .....	26
2.3 结果 .....	27
2.3.1 海绵中放线菌的分离 .....	27
2.3.2 海鞘中放线菌的分离 .....	29
2.4 讨论 .....	31
2.4.1 海绵相关微生物分离培养基的比较 .....	32
2.4.2 海鞘相关微生物分离培养基的比较 .....	34
2.4.3 海绵和海鞘相关微生物分离情况的共性和特异性比较 .....	34
2.5 小结 .....	35
<b>第 3 章 海绵中可培养放线菌的多样性研究 .....</b>	<b>36</b>
3.1 引言 .....	36
3.2 材料和方法 .....	37
3.2.1 材料 .....	37
3.2.1.1 仪器 .....	37
3.2.1.2 试剂 .....	37



3.2.2 方法 .....	38
3.2.2.1 海绵中可培养微生物基因组 DNA 提取 .....	38
3.2.2.2 放线菌 16S rDNA 的 PCR 扩增 .....	39
3.2.2.3 PCR 产物凝胶电泳 .....	39
3.2.2.4 适于目标菌株 16S rDNA RFLP 限制性内切酶的筛选 .....	40
3.2.2.5 海绵放线菌 16S rDNA 的 RFLP 分析 .....	40
3.2.2.6 16S rDNA 产物纯化和测序分析 .....	41
3.2.2.7 16S rDNA 测序结果的系统发育树分析 .....	41
3.2.2.8 GenBank 序列号申请 .....	42
<b>3.3 结果 .....</b>	<b>42</b>
3.3.1 放线菌基因组 DNA 提取 .....	42
3.3.2 16S rDNA 的 PCR 反应结果 .....	43
3.3.3 适于目标菌株 16S rDNA RFLP 限制型内切酶的筛选 .....	45
3.3.4 RFLP 结果 .....	48
3.3.5 海绵相关微生物 16S rDNA 的序列分析 .....	52
<b>3.4 讨论 .....</b>	<b>57</b>
3.4.1 RFLP 分析中限制性内切酶的选择 .....	57
3.4.2 分离菌株的 16S rDNA 的序列分析 .....	58
3.4.3 海绵中可培养微生物多样性异同比较 .....	59
<b>3.5 小 结 .....</b>	<b>60</b>
<b>第 4 章 海鞘中可培养放线菌的多样性研究 .....</b>	<b>62</b>
4.1 引言 .....	62
4.2 材料和方法 .....	62
4.2.1 材料 .....	62
4.2.1.1 仪器 .....	62
4.2.1.2 试剂 .....	63
4.2.2 方法 .....	64
4.2.2.1 海鞘中可培养微生物基因组 DNA 提取 .....	64

4.2.2.2 放线菌 16S rDNA 的 PCR 扩增 .....	64
4.2.2.3 PCR 产物凝胶电泳 .....	65
4.2.2.4 适于目标菌株 16S rDNA RFLP 限制性内切酶的筛选 .....	65
4.2.2.5 海鞘放线菌 16S rDNA 的 RFLP 分析 .....	66
4.2.2.6 16S rDNA 产物纯化和测序分析 .....	66
4.2.2.7 16S rDNA 测序结果的系统发育树分析 .....	67
4.2.2.8 GenBank 序列号申请 .....	67
<b>4.3 结果 .....</b>	<b>68</b>
4.3.1 放线菌基因组 DNA 提取 .....	68
4.3.2 16S rDNA 的 PCR 反应结果 .....	69
4.3.3 适于目标菌株 16S rDNA RFLP 限制型内切酶的筛选 .....	70
4.3.4 RFLP 结果 .....	70
4.3.5 海鞘相关微生物 16S rDNA 的序列分析 .....	74
<b>4.4 讨论 .....</b>	<b>81</b>
4.4.1 分离菌株的 16S rDNA 的序列分析 .....	81
4.4.1.1 测序结果与 RFLP 分组结果对比分析 .....	81
4.4.1.2 典型 RFLP 组的测序结果分析 .....	82
4.4.2 海鞘中可培养微生物多样性异同比较 .....	83
4.4.3 海鞘中高的放线菌多样性 .....	83
4.4.4 海绵与海鞘相关放线菌多样性比较 .....	84
4.4.5 海绵与海鞘相关放线菌多样性差异产生原因探讨 .....	87
<b>4.5 小结 .....</b>	<b>89</b>
<b>第 5 章 总结与研究展望 .....</b>	<b>91</b>
<b>5.1 总结 .....</b>	<b>91</b>
5.1.1 实验结论 .....	91
5.1.2 研究价值 .....	91
5.1.3 不足 .....	92
<b>5.2 研究展望 .....</b>	<b>93</b>

参考文献 .....	94
作者简介 .....	102
致谢 .....	103

厦门大学博士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

# Contents

<b>ABSTRACT in Chinese .....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT in English .....</b>	
<b>Chapter 1 Literature Review .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Sponges and sponge associated-microorganisms .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Sponges.....	2
1.2.2 The diversity of microorganisms associated with sponges.....	2
1.2.3 The relationship between sponges and associated-microorganisms. ....	3
1.2.4 The bioactivities extracted from sponges and associated-microorganisms.....	4
1.2.4.1 The bioactive products from sponges .....	4
1.2.4.2 The bioactive products from microorganisms associated with sponges.....	5
<b>1.3 Ascidians and ascidian associated-microorganisms.....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Ascidians.....	7
1.3.2 The diversity of microorganisms associated with ascidians .....	8
1.3.2 The bioactive products from ascidians .....	8
<b>1.4 The diversity of actinobacteria associated with sponges and ascidians .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Methods of the diversity analysis for sponge-associated</b>	
<b>microorganisms .....</b>	<b>12</b>
1.5.1 The application of isolation and cultivation in marine microbial diversity.....	12
1.5.2 The application of molecular technology in marine microbial diversity .....	13
1.5.2.1 16S rRNA gene investigation .....	13
1.5.2.2 Nucleic acid hybridizing detection .....	13
1.5.2.3 Methods based on PCR technology .....	14
1.5.3 The strategy to combine molecular and cultivation technology .....	14
1.5.4 Research progress on the methods to analyze the diversity of actinobacteria	
associated with sponges .....	15
<b>1.6 Research significance and aims .....</b>	<b>17</b>

1.6.1 Research significance.....	17
1.6.2 Research aims .....	18
<b>Chapter 2 Isolation of actinobacteria from sponges and ascidians ...</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Introduction.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Material and methods.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Material.....	21
2.2.1.1 Sample collection .....	21
2.2.1.2 Identification of sponges and ascidians .....	22
2.2.1.3 Reagents.....	23
2.2.1.4 Equipment .....	24
2.2.2 Methods .....	24
2.2.2.1 Preparation of sponges and ascidians samples .....	24
2.2.2.2 Isolation media.....	24
2.2.2.3 Isolation and cultivation of actinobacteria .....	25
2.2.2.4 Strains preservation .....	26
<b>2.3 Results .....</b>	<b>27</b>
2.3.1 Isolation of actinobacteria from sponges .....	27
2.3.2 Isolation of actinobacteria from ascidians .....	29
<b>2.4 Discussion.....</b>	<b>31</b>
2.4.1 Comparison of media used for sponges .....	32
2.4.2 Comparison of media used for ascidians .....	34
2.4.3 Comparison of isolation results between sponges and ascidians.....	34
<b>2.5 Conclusion .....</b>	<b>35</b>
<b>Chapter 3 Diversity investigation of culturable actinobacteria</b>	
<b>associated with sponges .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Introduction.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Material and methods.....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Material.....	37
3.2.1.1 Equipments .....	37

3.2.1.2 Reagents.....	37
3.2.2 Methods .....	38
3.2.2.1 DNA extraction from isolates associated with sponges..	38
3.2.2.2 16S rDNA PCR of actinobacteria .....	39
3.2.2.3 PCR products agarose gel electrophoresis .....	39
3.2.2.4 16S rDNA RFLP enzyme screening .....	40
3.2.2.5 16S rDNA RFLP of actinobacteria associated with sponges .....	40
3.2.2.6 16S rDNA purification and sequencing .....	41
3.2.2.7 16S rDNA sequencing and diversity investigation.....	41
3.2.2.8 GenBank accession numbers application.....	42
<b>3.3 Results .....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Genomic DNA extraction from actinobacteria .....	42
3.3.2 16S rDNA PCR results.....	43
3.3.3 16S rDNA RFLP enzyme screening .....	45
3.3.4 RFLP results .....	48
3.3.5 Sequencing investigation of isolates associated with sponges .....	52
<b>3.4 Discussion.....</b>	<b>57</b>
3.4.1 The choice of restriction digestion enzyme in RFLP analysis.....	57
3.4.2 16S rDNA sequences investigation of isolates.....	58
3.4.3 Comparison on the diversity of culturable microorganisms associated with sponges .....	59
<b>3.5 Conclusion .....</b>	<b>60</b>
<b>Chapter 4 Diversity investigation of culturable actinobacteria associated with ascidians .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Introduction.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2 Material and methods.....</b>	<b>62</b>
4.2.1 Material.....	62
4.2.1.1 Equipments .....	62
4.2.1.2 Reagents.....	63

4.2.2 Methods .....	64
4.2.2.1 DNA extraction from isolates associated with ascidians .....	64
4.2.2.2 16S rDNA PCR of actinobacteria .....	64
4.2.2.4 16S rDNA RFLP enzyme screening .....	65
4.2.2.5 16S rDNA RFLP of actinobacteria associated with ascidians .....	66
4.2.2.6 16S rDNA purification and sequencing .....	66
4.2.2.7 16S rDNA sequencing and diversity investigation .....	67
4.2.2.8 GenBank accession numbers application .....	67
<b>4.3 Results .....</b>	<b>68</b>
4.3.1 Genomic DNA extraction from actinobacteria .....	68
4.3.2 16S rDNA PCR results .....	69
4.3.3 16S rDNA RFLP enzyme screening .....	70
4.3.4 RFLP results .....	70
4.3.5 Sequencing investigation of isolates associated with ascidians .....	74
<b>4.4 Discussion .....</b>	<b>81</b>
4.4.1 16S rDNA sequences investigation of isolates .....	81
4.4.1.1 Comparison of sequencing results and RFLP grouping results .....	81
4.4.1.2 Sequencing results investigation of presentative RFLP patterns .....	82
4.4.2 Comparison on the diversity of culturable microorganisms associated with ascidians .....	83
4.4.3 High diversity of actinobacteria associated with ascidians .....	83
4.4.4 Comparison on the diversity of actinobacteria associated with sponges and ascidians .....	84
4.4.5 Factors impacting the differences of diversity .....	87
<b>4.5 Conclusion .....</b>	<b>89</b>
<b>Chapter 5 Summary and research development .....</b>	<b>91</b>
<b>5.1 Summary .....</b>	<b>91</b>
5.1.1 Experiment conclusion .....	91
5.1.2 Research valuation .....	91



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库